

## II. ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДВУХ ФАКТОРОВ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА

*М. М. Тихомирова*

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

В 20—40-е годы на основании большой группы фактов в радиобиологии и генетике сложилось представление о том, что при действии рентгеновых лучей и других видов ионизирующей радиации на клетку повреждения возникают непосредственно под лучом. Этому во многом способствовали монографии Ли (1946, в русском переводе 1963), Тимофеева-Рессовского и Циммера (Timoffeev-Ressovski и Zimmer, 1947), в которых конкретизировалось применение принципа попаданий в генетике.

В 1947 г. М. Е. Лобашев формулирует физиологическую (паранекротическую) гипотезу мутационного процесса. Согласно этой гипотезе мутация рассматривается как процесс. В становлении мутация проходит две фазы: фазу повреждения и фазу восстановления, но не тождественного восстановления (репарации). Частота возникающих мутаций определяется глубиной повреждения клетки, способностью ее к адаптации и репарации повреждения, скоростью восстановительных процессов после прекращения действия агента. Это была принципиально новая теория мутационного процесса, опередившая события не менее чем на десятилетие. Правда, как замечает автор, гипотеза была недостаточно обоснована экспериментально, но рисовала огромные перспективы исследования.

Возможность такого научного предвидения была во многом определена новым методом, примененным для изучения мутационного процесса. Этот метод сводился к последовательному действию двух различных агентов. Впервые он был использован в 1937 г. М. Е. Лобашевым и М. Т. Павловцем для анализа рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций и транслокаций у самцов дрозофилы. В качестве одного агента были использованы рентгеновы лучи, а в качестве второго — низкая (15°) температура. В ходе выполнения докторской диссертации М. Е. Лобашевым (1947) было показано, что эффект двух агентов не суммируется, а прогрессивно увеличивается. Повреждение, возникающее при действии агента, если оно не летально, находится в обратимом состоянии. Оно обязательно восстанавливается после прекращения действия агента, но восстановление может быть двояким: тождественное и тогда повреждение остается незамеченным, или не тождественное и тогда регистрируется мутация. Нетождественной репарации повреждений может способствовать действие второго агента. Этим и объясняется прогрессивное увеличение частоты мутаций при последовательном действии двух агентов.

Значительно позже опубликования физиологической (паранекротической) гипотезы мутационного процесса в литературе появляются

сведения об исследованиях, результаты которых убедительно говорят о том, что мутации возникают в процессе изменений, происходящих в клетке как в момент облучения, так и после него. Иными словами, они говорят о существовании последствий радиации, о котором писал М. Е. Лобашев в 1947 г. Сейчас является общепризнанным мнение о том, что мутация — это процесс.

Мак Элрой и Свенсон (McElroy, Swanson, 1951) предлагают гипотезу о метастабильном состоянии гена, из которого он может перейти или в исходное состояние, или в новое стабильное состояние, которое будет зарегистрировано как мутация. Гипотеза эта по сути дела принципиально не отличается от гипотезы М. Е. Лобашева.

Проводятся эксперименты, целью которых является ослабление или усиление действия радиации путем вмешательства в течение мутационного процесса. В ходе таких экспериментов облучение сочетают с действием разных температур, разного рода газов (например, азот, гелий, кислород), химических веществ (цистеин, аланин, ЭДТА), других видов излучений (инфракрасные и ультрафиолетовые лучи) или применяют фракционированное облучение. Нетрудно заметить, что общим для всех такого рода работ является использование двух агентов (Корогодин, 1966; Жестяников, 1968; Лучник, 1968; Парибок, 1970).

В 1956 г. Свенсон вводит понятие истинного и потенциального повреждений. Истинное повреждение — это повреждение, возникающее и реализующееся под лучом, его нельзя модифицировать после облучения. Потенциальное повреждение замечательно тем, что оно возникает под лучом, но судьба его решается после прекращения облучения. Оно может быть или восстановлено в исходное состояние, или реализовано в истинное и зарегистрировано обычными методами генетического анализа.

Изучению роли закономерностей восстановительных процессов в становлении того или иного типа мутации, природы восстановительных систем в клетке и организме посвящено много исследований. Однако природа и механизмы восстановления изучены еще недостаточно хорошо. Несомненным можно считать, что восстановление — это метаболический, ферментативный процесс, происходящий с затратой энергии (участие системы АТФ обязательно) и требующий определенного температурного режима. Фотореактивация и темновая репарация, очевидно, являются наиболее универсальными механизмами восстановления. Сущность потенциальных изменений пока тоже неизвестна (Корытова и др., 1971).

Возможность же модификации эффекта рентгенизации имеет не только теоретический интерес, но и большое практическое значение. Факторы, уменьшающие эффект радиации, могут быть использованы для предотвращения вредных биологических последствий облучений, а факторы, усугубляющие эффект радиации, — для повышения эффекта лучевой терапии в медицине и при получении мутаций в селекции.

В настоящее время перед исследователями стоит задача познания закономерностей мутационного процесса. И на этом этапе исследования метод последовательного действия двух агентов продолжает играть важную роль. По предложению и под руководством М. Е. Лобашева была проведена серия исследований мутационного процесса у дрозофилы методом последовательного действия рентгеновых лучей и высокой температуры (37°С) и установлены следующие закономерности.

При облучении самок дрозофилы одной и той же линии (Кантдн-С) рентгеновыми лучами разной жесткости («жесткие» — напряжение 180—200 кв, «мягкие» — 50 кв) в одинаковой дозе (3000 р) возникают разного рода первичные повреждения. В качестве индикатора повреждений регистрировались потери X-хромосом, т. е. частота появления ис-

ключительных самцов ХО. Жесткие лучи индуцируют как истинные, так и потенциальные повреждения. О наличии потенциальных повреждений судили по избытку исключительных самцов в группе, где после облучения самки дополнительно подвергались действию высокой температуры, над суммой исключительных самцов в группах, где самки подвергались облучению и действию высокой температуры, примененных порознь (Тихомирова, 1964).

Способность радиации вызывать в клетке потенциальные изменения, реализующиеся после окончания ее действия, принято определять как последствие радиации. И, действительно, их выявление возможно после прекращения действия радиации путем дополнительного действия высокой температурой, которая увеличивает вероятность их реализации и способствует их регистрации. Без воздействия высокой температуры они восстановились бы и не были бы зарегистрированы. Долю потенциальных повреждений от общего числа истинных можно выражать в процентах и использовать для количественной характеристики мутационного процесса. Эта величина была названа эффектом последствия (Тихомирова и др., 1964).

Жесткие рентгеновы лучи, использованные в эксперименте, характеризовались эффектом последствия (ЭПД) в 56%. При облучении самок дрозофилы мягкими лучами частота потери Х-хромосом пропорциональна мощности (мощность 1932 р/мин — эффективность 1 р —  $61 \cdot 10^{-5}\%$  самцов ХО; мощность 100 р/мин —  $32 \cdot 10^{-5}\%$ ). Это говорит о том, что первичные скрытые повреждения возникают также при действии этих лучей, но они очень быстро восстанавливаются (Тихомирова, 1964). Это заключение было подтверждено на линии с кольцевыми Х-хромосомами тем фактом, что ЭПД наблюдался лишь при применении высокой температуры немедленно после облучения мягкими лучами (ЭПД = 120%) и не наблюдался при ее действии через один час после облучения (Тихомирова и др., 1967).

Эффект последствия обратно пропорционален дозе рентгеновых лучей. Это было показано как на самцах (Ватти и др., 1967), так и на самках (Петрова, Тихомирова, 1973; Тихомирова, Петрова, 1973) при учете частоты рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций, разрывов и потерь Х-хромосом, доминантных летальных мутаций на нескольких линиях дрозофилы. Можно предположить, что рентгеновы лучи в разной дозе могут вызывать истинные и потенциальные повреждения в разных пропорциях или это может определяться разной степенью поражения восстановительных систем клетки. Рассмотренные результаты экспериментально подтверждают положение паранекротической гипотезы о том, что возникновение мутации определяется глубиной повреждения и степенью поражения восстановительных систем.

Для получения количественной характеристики кинетики восстановления высокая температура (37°С) давалась через разные интервалы времени (0, 30, 60, 120 мин) после облучения (2000 р) самок дрозофилы с кольцевыми Х-хромосомами. При учете частоты потерь Х-хромосом было показано, что ЭПД экспоненциально зависит от длительности этого интервала. На основании этого можно заключить, что в нормальных условиях восстановление потенциальных повреждений идет неравномерно: самое интенсивное восстановление идет в первые 30 мин после облучения (ЭПД = 320%), а затем пропорционально предшествующему уровню. Процесс восстановления заканчивается к 120 мин и ЭПД в этом случае равен 0, хотя теоретически ожидаемая величина ЭПД еще равна 17% (Тихомирова, 1965; Тихомирова и др., 1967).

Для изучения кинетики восстановления была использована также разная экспозиция высокой температуры (2, 4, 8 ч) после облучения

(действие высокой температуры начиналось через 30 мин). Была показана асимптотическая зависимость частоты потерь от длительности температурной экспозиции. ЭПД прямо пропорционален длительности экспозиции (в пределах 2—8 ч). Отсюда можно заключить, что процесс нетождественного восстановления (или реализация потенциальных повреждений) происходит и в нормальных температурных условиях (из уравнения прямолинейной регрессии оценивается в 12%) наряду с более интенсивными процессами тождественного восстановления (320%), имеющими место после облучения в клетке.

Что касается механизма действия высокой температуры на клетку, то наиболее вероятным является предположение, что высокая температура выключает восстановительные системы клетки и тем самым способствует реализации потенциальных повреждений (Тихомирова и др., 1967).

Качество вызываемых повреждений и их восстановление определяются генетическими свойствами линий дрозофилы и стадией гаметогенеза, на которую действует радиация. Так, при учете частоты потери X-хромосом показано существование линий, в которых относительно чаще появляются потенциальные повреждения, чем истинные (например, линия  $\omega''$ ), или наоборот (линия Кантон-С). Существуют линии, в гамететах которых одинаково часто появляются и потенциальные и истинные повреждения (линии С-3 и С-5). На основании этого можно говорить, что в определении радиочувствительности организма относительно независимую роль играют чувствительность генетических структур клетки и ее восстановительных систем (Тихомирова, 1966).

При учете того же типа мутаций на одной и той же линии в овогенезе наиболее чувствительными являются ооциты 14-й стадии, в них возникают как истинные, так и потенциальные изменения, причем ЭПД составляет 320%. Менее чувствительны ооциты 1—7-й стадий (ЭПД = 200%); потенциальные изменения реализуются в них лишь при действии высокой температуры в течение 8 ч; если температура действует менее продолжительный срок (2—4 ч), они восстанавливаются (ЭПД = 0). Оогонии, облученные в организме самки на любой стадии онтогенеза (личинка или имаго), не чувствительны к действию радиации. В них не удастся зарегистрировать ни истинных, ни потенциальных повреждений. Причиной этого может быть не их нечувствительность к действию радиации, а зачатковый отбор (Тихомирова, 1961, 1967).

Эффект последствия радиации зависит и от типа индуцируемых мутаций. Так, на самках одной линии (Д-18), облученных рентгеновыми лучами в разных дозах (от 100 до 1500 р), эффект последствия на доминантных летальных мутациях был обнаружен лишь при действии радиации в дозах 100 и 500 р, на нерасхождении X-хромосом — не показан вообще, на потери X-хромосом — в дозах 500 и 1500 р, а на рецессивных, сцепленных с полом летальных мутациях — только в дозе 1500 р. Величина ЭПД также зависит от типа мутаций. Так, ЭПД рентгеновых лучей в дозе 500 р на доминантные мутации составляет 1,2%, а на потери X-хромосом — 70,6%. Это убедительно говорит о разной природе сравниваемых типов мутаций (Петрова, Тихомирова, 1973; Тихомирова, Петрова, 1973).

При изучении доминантных летальных мутаций методом последовательного действия рентгеновых лучей и высокой температуры было зарегистрировано еще одно свойство рентгеновых лучей. Они вызывали в клетке такие изменения, которые делали ее резистентной к последующему действию высокой температуры. Эти изменения можно интерпретировать как защитное последствие радиации и оценивать количественно, рассчитав отрицательный эффект последствия (отноше-

ние разности между появившимися повреждениями при последовательном действии рентгеновых лучей и высокой температуры и суммой повреждений, которые зарегистрированы при действии этих агентов, применяемых порознь к этой сумме).

Оказалось, что эффект отрицательного последействия нелинейно уменьшается с дозой. Это значит, что эффект защиты обратно пропорционален дозе. В отличие от защитного последействия радиации потенциальные повреждения, вызываемые ею, можно называть повреждающим последействием радиации. Вероятным кажется предположение, что рентгеновы лучи в любых дозах вызывают как защитный, так и повреждающий эффект последействия, но соотношение их зависит от дозы, типа учитываемых мутационных изменений и свойств линии дрозофилы (Петрова, Тихомирова, 1973).

Краткое перечисление установленных закономерностей мутационного процесса показывает, что применение метода последовательного действия двух агентов очень перспективно и сулит еще очень многое в дальнейшем познании этого процесса.

### Summary

By sequential action of X-ray and high temperature (37°C) (as proposed by M. E. Lobashev) the dependence of X-ray after-effects on their hardness, rate and dose, on a mode of high temperature action, stages of gametogenesis, lines, and on the type of the studied mutational changes has been estimated. The injurious and protective after-effects of radiation have also been shown. The validity of the method in study of mutational process characteristics has been discussed.

### ЛИТЕРАТУРА

- Ватти К. В., Викторова Г. В., Беляцкая О. Я. Эффект последействия разных доз рентгеновых лучей у линий дрозофилы с различной радиочувствительностью. — В кн.: Исследования по генетике. 1967, вып. 3, с. 40—48.
- Жестяников В. Д. Восстановление и радиорезистентность клетки. М., 1968. 351 с.
- Корогодин В. И. Проблемы пострадиационного восстановления. М., 1966. 391 с.
- Корытова А. И., Михайлов О. Ф., Дубинин Н. П. Потенциальные изменения хромосом при взаимодействии радиации и алкилирующих соединений. — «Генетика», 1971, т. VII, № 8, с. 10—18.
- Ли Д. Действие радиации на живые клетки. М., 1963. 288 с.
- Лобашев М. Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1947, № 8, с. 10—29.
- Лобашев М. Е., Павловец М. Т. Влияние температуры на облученные зачатковые клетки у *D. melanogaster*. — Биол. журн., 1937, № 3, с. 689—696.
- Лучник Н. В. Биофизика цитогенетических повреждений и генетический код. М., 1968. 296 с.
- Парибок В. П. Восстановление при лучевом повреждении хромосом. — В кн.: Пострадиационная репарация. М., 1970, с. 154—190.
- Петрова Л. Г., Тихомирова М. М. Изучение эффекта последействия радиации на разные типы мутаций у дрозофилы. I. Доминантные летальные мутации. — «Генетика», 1973, т. IX, № 5, с. 56—65.
- Свенсон К. Влияние напряжения кислорода на образование разрывов хромосом под действием ионизирующих излучений. — В кн.: Вопросы радиобиологии. М., 1956, с. 404—416.
- Тихомирова М. М. Влияние X-лучей на нерасхождение X-хромосом. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1961, вып. 1, с. 19—24.
- Тихомирова М. М. Нерасхождение хромосом при действии рентгеновых лучей разной жесткости и мощности. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1964, вып. 2, с. 56—64.
- Тихомирова М. М. О механизме возникновения анеуплоидных гамет при действии X-лучей. — «Генетика», 1965, № 4, с. 63—68.
- Тихомирова М. М. Сравнительное изучение радиочувствительности различных линий дрозофилы. — «Генетика», 1966, № 3, с. 93—97.
- Тихомирова М. М. Сравнительное изучение радиочувствительности различных стадий оогенеза. — «Генетика», 1967, № 6, с. 24—32.
- Тихомирова М. М., Дуброва С. Е., Януш И. М. Сравнительное изучение эффекта последействия радиации на нерасхождение хромосом. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1964, вып. 2, с. 65—68.

- Тихомирова М. М., Джимелли А. А., Беляцкая О. Я. Генетический эффект последствия рентгеновых лучей в зависимости от режима действия температуры. — «Генетика», 1967, № 5, с. 92—104.
- Тихомирова М. М., Петрова Л. Г. Изучение эффекта последствия радиации на разные типы мутаций у дрозофилы. II. Нерасхождение и потери X-хромосом. — «Генетика», 1973, т. IX, № 6, с. 81—92.
- Mc Elroy W. D., Swanson C. P. The theory of rate processes and gene mutation. — Quart. rev. biol., 1951, vol. 26, No 4, p. 348—363.
- Timofeeff-Ressovsky N. W., Zimmer K. G. Biophysik. Bd. 1. Das Trefferprinzip in der Biologie. S. Hirsel Verlag, 1947, Leipzig.

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МУТАБИЛЬНОСТИ ОСОБЕЙ РАЗНЫХ ПОЛОВ. I. МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ

К. В. Ватти

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

У многоклеточных организмов, которые представляют собой интегрированные биологические системы, в отличие от одноклеточных существует возможность контролирования мутационного процесса как со стороны целого организма, так и отдельных его систем.

Впервые эта идея была высказана М. Е. Лобашевым (1947) в предложенной им физиологической (паранекротической) гипотезе мутационного процесса. Одной из возможных моделей для изучения организменного и системного контроля мутационного процесса является сравнительное изучение мутабельности особей разных полов, так как известно, что самцы и самки различаются по интенсивности метаболизма, активности ферментных систем, гормональной деятельности. Это касается птиц и млекопитающих (Шредер, 1965; Pinto, Bartley, 1969, и др.), а также насекомых (Hunter, Cediell, 1963; Chen, 1966; Johnson, Kapari, 1966; Rensing e. a., 1968; Rensing, 1969; Марвин, 1970, и др.) и других животных.

Используя случаи полового диморфизма, например, по одним ферментным системам и его отсутствие — по другим, а также учитывая участие подобных систем в восстановлении генетического аппарата клетки от поражения или исследуя виды, где у одного из полов не идет кроссинговер и, следовательно, исключается возможность восстановления повреждения за счет рекомбинации, можно вычлени в общем понятии «организменный контроль мутационного процесса» отдельные слагающие его элементы — системы.

С другой стороны, половые клетки самок и самцов, находящиеся на идентичных этапах гаметогенеза, различаются многими структурными и метаболическими особенностями, что также открывает возможности изучения роли соответствующих клеточных параметров в мутационном процессе. Так, например, сравнивая у дрозофилы функционально и морфологически идентичные гониальные клетки, можно прийти к выводу, что оогонии (King e. a., 1956) в отличие от сперматогоний (Tihen, 1946; Cooper, 1950) обладают значительно меньшей скоростью делений. Общеизвестно также, что у насекомых (de Wilde, 1964), птиц (Olsen, 1942; Романов, Романова, 1959), млекопитающих (Равен, 1964; Пожидаев, 1967) ооциты содержат значительно большее количество цитоплазмы, чем сперматоциты. На мейотической стадии гаметогенеза очень существенны различия между полами по характеру делений. Благодаря атрезии значительной части фолликулов и образованию полярных телец в оогенезе имеются большие возможности для зачаткового отбора, чем в сперматогенезе, где каждый из четырех продуктов мейоза образует